HMA의 세포내 산도증가가 온열과 항암화학 치료의 세포독성에 미치는 효과

동아대학교 의과대학 치료방사선과학교실
미네소타 주립대학 치료방사선과 방사선 생물학부*

허 원 주 · 송 창 원*

Abstract=

Effect of Increased Intracellular pH by HMA on the Cytotoxicity of Combined Treatment of Hyperthermia and Chemotherapy

Won Joo Hur, M.D. and Chang Won Song, Ph.D.*

Department of Radiation Oncology, College of Medicine, Dong-A University, Pusan, Korea
**Department of Therapeutic Radiology-Radiation Oncology, University of Minnesota Medical School, Minnesota, U.S.A.*

Purpose : The enhanced cytotoxic effect of combined treatment of hyperthermia and chemotherapy by increasing intracellular acidity with HMA was investigated.

Materials and Methods : FSall tumor cells were injected on the hindlegs of female C_3H mice. When the tumor volume reached about 200mm^3, experiments were performed on the groups classified as follows:
Group I : Control,
Group II : Melphalan alone (2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg, 15mg/kg),
Group III : Heat alone (42.5℃ for 1 hour),
Group IV : Melphalan + Heat (42.5℃ for 1 hour),
Group V : HMA(10mg/kg) + Melphalan(5.0mg/kg) + Heat(42.5℃ for 1hour).
Each group included 8-12 mice on each experiment. HMA (3-amino-6-chloro-5-(1-homopiperidyl)-N-(diaminomethylene)-c-pyrazinecarboxamide), an analog of amiloride which increases intracellular pH(pHi) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMS) and injected into the tumor-bearing mice through the tail vein. 10mg/kg of HMA and each dose of melphalan were injected into peritoneum of the tumor-bearing mice 30 minutes before heating. Tumor growth delay was calculated when the tumor volme reached at 1500mm^3. Excision assay was performed on each group and repeated 2-4 times.

Results : Tumor growth delay of each experimental groups at 1500mm^3 were 9, 10, 13 and 19 days respectively. In vivo-in vitro excision assay using FSall tumor cells, the cytotoxicity of each experimental groups was 1.2×10^7, 1×10^7, 6×10^6, 1.7×10^6 and 1×10^5 clonogenic cells/gm respectively. When HMA was added to the combined treatment of heat and chemotherapy, the

tumor growth was delayed more than combined treatment without HMA i.e., 6 days tumor growth delay at 1500mm^3 of tumor volume.

Conclusion : The combined effect of cytotoxicity by heat and chemotherapy can be much more enhanced by HMA.

Key Words : Intracellular pH, HMA, Chemotherapy and Hyperthermia

서 론

세포내 산도와 온열치료의 상관관계는 이미 많은 기초실험과 문헌에서 밝혀져 있는 바[1-3] 세포내 산도가 높을수록 온열 치사 효과도 높아짐은 주지의 사실이다[4-7]. 또 최근까지 온열치료를 항암 화학약물과 병용하여 세포독성 효과를 높이고자하는 시도가 계속되고 있는데[8-11] 이때 약물에 따라서는 산성환경에서 세포독성 효과가 더 높은 것으로 보고되고 있다[12-14]. 그러나 이러한 현상도 온열치료의 경우처럼 세포내 산도가 증가되면 세포독성 효과가 더 높아지는지의 여부는 잘 알려져 있지 않다. 저자들은 항암제 중 alkylating agent인 melphalan을 온열치료와 병용 하여 세포독성에 미치는 영향을 보고 나아가 amiloride 유도체인 HMA(3-amino-6-chloro-5-(1-homopiperidyl)-N-(diaminomethylene)-c-pyrazine carboxamide)를 동시에 투여해 세포내 산도를 인위적으로 증가시켰을 때 초래되는 세포독성의 증강효과를 알아보고자 본 실험을 시도하였다.

대상 및 방법

1. 세포주 및 배양조건

종양세포는 C$_3$H 마우스에서 생장할수 있는 FSall 세포를 사용하였다. 먼저 액화 질소로 동결보존된 FSall 세포를 실온에서 해빙, 0.25% 트립신으로 세척 수확하여 RPMI 1640 배지를 함유한 Falcon flask에서 재배양하여 지수상 성장 (exponential growth)을 한 세포주만 선택하여 실험에 사용하였다.

2. 종양접종

실험동물도 FSall 세포의 동계인 C$_3$H 마우스를 사용하였으며 FSall 세포를 동결상태에서 해빙시켜 10회 이내의 세대 배양을 거친후 세포주를 RPMI 1640 배지에 현탁 시켜 8~10주된 암컷 C$_3$H 마우스의 뒷다리에 2x10^{5}개의 세포를 피하 접종하였다. 접종 후 7~8일이 경과하여 종양의 최장축이 6~8mm, 종양용적이 약 200mm^{3}에 도달했을 때 약제 투여 및 가온등의 처치를 시행하였다.

3. 약제투여 및 가온처치

HMA는 이뇨제로 흔히 사용되고 있는 amiloride의 유도체로서 Lee등[15]이 문헌에 소개한 방법으로 합성하여 사용하였는데 그 구조식은 Fig. 1에서 보는바와 같으며 이 약제에 의한 세포내 산도 증가의 효과는 Song등[16]이 이미 실험으로 보고한 바가있다. 분말로 되어있는 이 약제를 dimethyl sulfoxide (DMSO) 용매에 용해시킨 다음 온열처리 20분전 마우스의 tail vein을 통해 각군에 일률적으로 10mg/kg를 주입하였다. 한편 항암제 처치는 alkylating agent인 melphalan (Sigma Chemical Company, St Loius, MO, USA)을 온열처지 30분전 복강내 주입하였는데 각군의 농도를 달리하여 2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg, 15mg/kg를 각각 주입하였다. 가온은 42.5℃로 고정하여 온열수조 (Thermolux 480, 서독 Braun 회사제품)에서 60분간 시행하였는데 특별히 제작한 plastic jig를 사용하여 종양이 이식된 다리를 부착밴드로 잘 고정시킨 다음 가온하였다. 이때 종양의 온도는 바늘형(needle type) thermocouples로 측정하였는데 종양내 온도가 온열수조의 수온보다 0.1~ 0.3℃ 더 낮은 것으로 관찰되었다. 가온후 쥐들은 jigs에서 이탈시켜 일부는 각각의 cage로 복귀시켜 종양성장지연 계측의 실험을 하였고

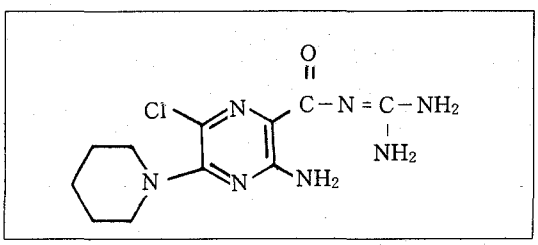

Fig. 1. Chemical structure of HMA.

일부는 즉시 희생(도살)시켜 in vivo-in vitro excision assay를 시행하였다.

4. 종양성장지연 계측

종양의 크기는 매일 한 차례씩 측정하였고 종양의 체적은 $V= a^2b/2$ 의 공식으로 계산하였다. 이때 a 와 b는 각각 종양의 단축 및 장축을 표식한다. 치료법에 따라 대조군(Group I), melphalan 단독군(Group II), 온열치료 단독군(GroupIII), 온열치료와 melphalan을 병용 치료한 군(Group IV) 그리고 온열치료와 melphalan 병용치료시 HMA를 동시에 투여한 군(Group V)으로 나누어 관찰하였다. 각군의 실험은 8~12마리의 마우스로 2~4회 반복하여 결과를 도출하였으며 선형감쇄법에 의거하여 각 군 모두 최초 종양체적(약 200mm^3)의 7~12배(1400~2400mm^3)의 크기로 자라는데 필요한 충분한 날수 (± 95% confidence interval)까지 계측을 진행하였고 종양체적이 1500-2000 mm^3에 도달했을때 각군의 종양성장지연 정도를 판정하였다.

5. In Vivo-In Vitro Excision Assay

각 군의 세포독성 효과의 판정은 in vivo-in vitro excision assay법으로 시행하였다. 즉 약물처리 및 가온처리 직후 일련의 숙주 생쥐들을 경추탈골법으로 도살시킨후 무균상태에서 종양조직을 절개한 다음 불필요한 조직들을 제거 정돈 시킨후 이 종양조직을 수술용 가위를 사용하여 미세한 절편으로 다진후 0.025% trypsin과 15units/ml의 DNAse 를 함유한 RPMI 1640 배지에서 20분간 고정시켰다. 이후 이 종양세포의 현탁액을 세포여과기(strainer)로 여과시키고 소량의 송아지 혈청을 첨가시켜 trypsin의 활성을 중화시킨후 이 용액을 2차에 걸쳐 원심분리시켜 세포를 세척한후 신선한 배지에서 배양시켰다. 동일한 방법으로 처리된 각군의 종양세포에 trypan blue를 첨가하여 이 시약을 축출한 세포만을 집계한후 세포의 농도에 따라 각 군별로 $2x10^3$/ml~$2x10^6$/ml의 갯수를 확보하여 10% calf serum을 첨가한 RPMI 1640 배지와 함께 25cc Falcon flask에 monolayer로 plating 하였다. 이때 CO_2 3cc를 각 flask에 일률적으로 주입하여 배지의 산도가 pH7.0~7.2의 중성으로 유지되도록 하였다. 이후 각 flask를 5% CO_2 를 함유한 37℃ 배양기에 7일간 배양한 다음 메타놀에 고정한 후 crystal violet으로 염색하여 콜론수를 집계하였다. 각 세포군에서 plating efficiency의 값을 구한 후 종양 1mg당 얻어진 세포수를 산출하고 최종적으로 종양 1mg당 콜론형성 세포수를 집계하여 종양 치사 효과를 판정하였다.

결 과

1. 종양 성장 지연

1) Melphalan과 온열치료 병용 효과

Melphalan의 농도를 증가시키면서 melphalan 단독에 의한 종양성장지연과 온열치료와의 병행시 성장지연을 비교하니 Fig. 2에 보는바와 같이 약물처리와 온열치료를 병행한 군에서 성장지연이 더욱 뚜렷하였고 이러한 효과는 약제의 혈중농도를 증가시킬수록 더 현저한 양상을 보였다. 즉 15mg/kg의 melphalan을 투여했을 경우 약제 단독군에서는 종양의 용적이 2000 mm^3에 달하는데 약 6일의 성장지연을 보였으나 온열요법과 병용 치료한 군에서는 23일로서 4배정도의 성장지연 효과를 볼수 있었다.

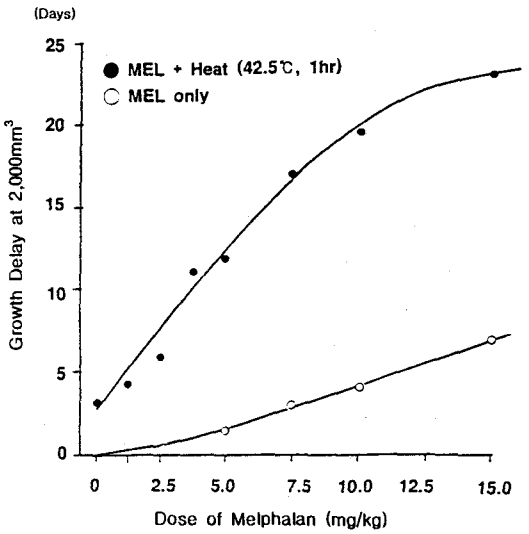

Fig. 2. Marked tumor growth delay was noted by the combined treatment of hyperthermia and chemotherapy than hyperthermia alone. This phenomenon was accentuated as drug concentration increased. Tumor growth delay was calculated at 2000mm^3 of tumor volume.

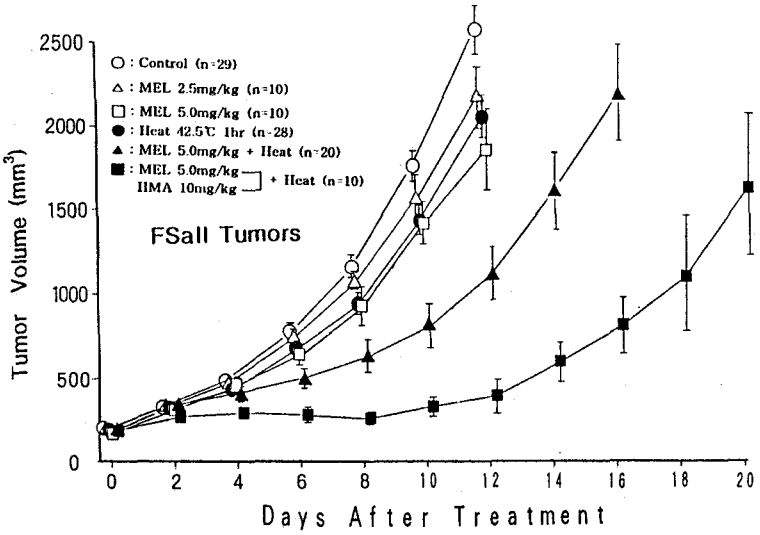

Fig. 3. Results of tumor growth delay(TGD) according to each experimental groups. Tumor growth delay was more prolonged when HMA was added to the combined treatment of hyperthermia and chemotherapy than without HMA.

2) 세포내 산도 증가의 효과

Melphalan과 온열치료에 추가하여 HMA를 투여하여 세포내 산도를 증가시켜보니 HMA를 사용한 군과 사용하지 않은 군에서 세포치사 효과에 현저한 차이를 볼 수 있었다. 먼저 대조군과 온열치료 및 melphalan을 단독으로 사용하여 종양성장지연 효과를 비교하니 온열치료나 melphalan 투여군에서 대조군보다 의미있는 종양성장지연은 볼 수 없었다. 온열치료의 경우 종양이 1500mm^{3}에 달하는데 대조군보다 약1.5일정도의 성장지연을 보였으며 melphalan의 경우도 약제의 농도를 2.5mg/kg및 5.0mg/kg로 달리해 주어도 의미있는 차이를 볼 수 없었다. 즉 종양이 약 1500mm^{3}에 달하는데 대조군은 평균 9일이 소요된 반면 2.5mg/kg와 5.0mg/kg 의 melphalan 단독치료군에서는 각각 10일 및 11일 정도의 기간이 걸렸다. 그러나 melphalan 5.0mg/kg를 42.5℃ 온열치료와 병용한 군에서는 13일, melphalan 및 온열치료와 함께 HMA를 사용하여 종양내 산도를 증가시켰을 경우는 약 19일이 소요되어 HMA를 사용하지 않고 온열치료와 약제를 병용한 경우보다는 HMA를 사용하여 세포내 산도가 증가된 경우 6일 이상의 성장지연을 보였다(Fig. 3).

2. In vivo-In Vitro Excision Assay

Melphalan 과 함께 HMA를 병용 사용한후 온열치료를 시행한 군이 HMA를 사용하지 않은 군보다 현저한 세포 치사 증강 효과를 나타내었다. 즉 약제 단독이나 온열치료만을 시행한 경우 대조군보다 3~4배 정도의 치사증강 효과를 보였고 약제와 온열치료를 병행한 경우는 약 10배정도의 치사증강 효과를 보인 반면 HMA를 약제와 온열병용치료에 추가한 경우 HMA를 사용하지 않은 군보다 30배 이상, 아무런 치료를 하지않은 대조군보다는 250배 이상의 세포치사 증강 효과를 보여 세포내 산도의 증가가 세포치사 효과를 현저히 증강시킴을 알 수 있었다(Fig. 4).

고 찰

온열요법은 세포주기내에서 방사선에 저항을 보이는 DNA합성기(S-phase)의 세포에 가장 민감하게 작용하고 또 방사선에 내성이 강한 저 산소 저 pH세포(hypoxic-acidotic cell)에 감수성이 높은 것으로 알려져 있다[17]. 이러한 특성은 종양세포의 선택적 치사를 초래해 온열요법을 항암치료에 응용하는 이론적 배경이 되고 있는데 특히 종양세포 내외의 산도가 종양세포의 선택적 치사에 밀접한 관계가 있음은 잘 알려져 있다[1-7]. 종양세포는 대개 정상세포보다 세포분열 및 조직 성장이 급속히 이루어짐으로 산소나 영양소의 요구량은 정상세포보다 현저히 높은 반면 이들을 원활히 공급하기위한 혈관상은 미성숙되고 조악하다[18-24]. 따

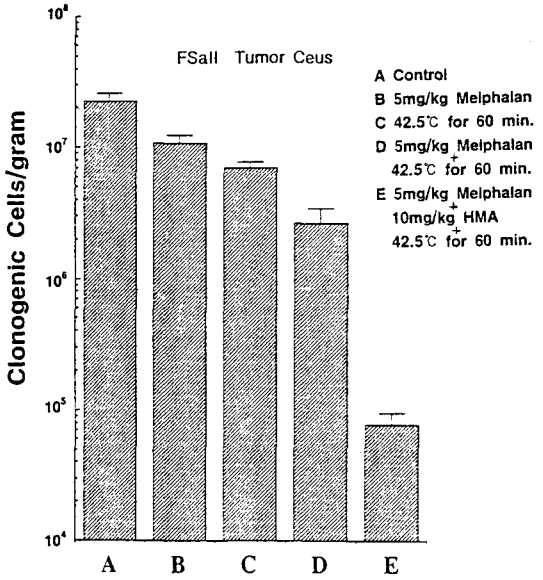

Fig. 4. Results of in vivo-in vitro excision assay. The cytotoxicity of the combined treatment of hyperthermia and chemotherapy was notably enhanced by increased intracellular pH with HMA.

라서 종양세포내 당대사는 불충분한 혈액 공급과 저산소상태에서 이루어져 과도한 젖산이 축적되고 필연적으로 종양세포 내외의 산도는 정상 조직보다 높게된다. 보고자들에 의하면 종양세포는 가온을 하는 동안에도 세포내 pH가 현저히 감소된다고 하며 이것은 조악한 종양세포의 혈관들이 열에 의한 손상을 받기가 쉽고 이로인해 젖산과 β-hydrobutylic acid들이 축적되면서 급박한 산도 부과가 생겨 온열치료에 의한 세포치사 효과가 가속화되는 것으로 설명하고있다[17, 25, 26]. 이 경우 세포내 산도(pHi)가 세포외 산도(pHe)보다 열치사효과(thermosensitizing effect)를 더욱 증강시키는 것으로 되어 있는데 특히 김등[27, 28]은 선택적으로 세포내 산도를 증가시키는 약제인 amiloride을 사용하여 세포내 산도를 인위적으로 높여 온열치사 효과가 증강됨을 관찰하였고 이러한 결과는 온열치료 후 가치사손상(sublethal damage)을 받은 세포들의 회복지연과 연속적인 가온후 생기는 온열내성세포(thermotolerant cell)들의 온열감수성(thermosensitivity)효과를 증가시켜 줌으로써 이루어진다고 하였다. Gerweck등[3]은 Chinese hamster ovary cells(CHO cells)에 41~44℃의 가온을 해주고 세포치사 효과를 관찰하였는데 배양액의 산도를 7.6에서 6.7로 낮추었을 때 세포치사 효과가 훨씬 증가됨을 관찰하였고 이러한 온열치사 효과는 41~42℃사이에서 더욱 현저하다고 하였다. 또 최근 Song등[16]도 amiloride의 analog인 HMA를 사용하여 Na/H^+ antiport를 차단시켜 세포내 산도를 증가시킴으로써 온열치료 단독의 경우보다는 현저한 세포치사 효과를 보고하여 위의 사실을 뒷받침하고 있다. 결론적으로 세포외 산도보다는 세포내 산도가 온열치사에 더욱 밀접하게 작용하는 것을 알 수 있다.

최근에는 종양치료에 사용되는 항암제와 환경산도와의 관계에 대한 관심이 고조되어 많은 보고들이 이루어지고 있다[12-14]. 항암약제는 고유의 약효를 발휘하기 위해서는 혈류를 통한 약제의 전달이 종양까지 적절히 이루어져야하고 또 이러한 약제가 종양 주위의 간질성 공간(interstitial space)에 도달되었을 때 종양세포에 의한 섭취(uptake)가 충분히 이루어져야 한다. 대부분의 항암약제는 그 자체에 산이나 염기성 성상(moieties)을 지님으로써 약제가 혈장내로 일출되었을 때(extravasated) 세포내외의 환경산도가 약제의 세포내 이동(능동적, 수동적 이동)에 영향을 미칠 것은 당연하다. Jahde등[29]은 cyclophosphamide같은 metabolite계 항암제에서 약제의 치사효과와 환경산도와의 관계를 규명하였는데 이들은 cyclophosphamide계들의 약제는 중성이나 알카리성보다 산성환경에서 세포치사 효과가 훨씬 높다고하면서 이것은 약제들이 pH가 낮은 환경에서 세포내 섭취가 더 잘되고 DNA의 monofunctional 알칼리화도 현저하기 때문이라고 하였다. 이러한 사실은 Skarsgard등[30]도 보고하고 있는데 이들 역시 melphalan과 chlorambusil의 약제독성이 산성환경에서 증가되는 것을 관찰하고 이것은 종양세포에 의해 세포내로 약제의 섭취가 증가되기 때문이라고 주장하였다. 또 Kennedy등[31]은 mitomycin C의 세포치사 효과가 산성환경에서 증가되는 것은 세포외 산도보다 세포내 산도가 더 밀접하게 작용하는 것으로 설명하면서 이것은 산성환경에서 약제가 세포내 DNA의 cross- linking을 증가시킴으로써 초래된다고 하였다. 그러나 학자에 따라서는 metabolite계 약제 중 ifosfamide나 혹은 alkylating 약제인 MMS(Methyl methane sulphonate), BCNU등은 약제의 독성이 환경산도와 무관하다고 주장하고 있는데[12, 13] 그 기전에 대한 설명은 불충분하다. 한편 Vinblastine이나 vincristine같은 alkaloid들은 산성환경에서 약제의 독성이 오히려 감소되는 것으로 되어있고[32] 보고자들은 이들 약제가 산성환경에서 해리도(dissociation)가 중성환경에서보다 더 낮아지기 때문이라고 추정하고 있다. 한편 항암제와 온열치료를 병행하였을 때 환경산

도의 변화와 세포치사 효과에 대한 연구도 활발히 진행되고 있는데 Hahn등[33]은 항암제를 온열치료와 병행했을 때 가온으로 인해 약제의 세포내 섭취가 증가되나 가온 자체가 약제에 의한 세포손상을 지연시킨다고 보고하고 이때 종양세포 주위의 산성환경이 이러한 약제 및 가온에 의한 세포치사 효과를 활성화시킨다고 주장하고있다. Hahn과 Shiu등[34]은 이와 연관하여 bleomycin, amphotericin B, cisplatin등의 약제를 사용하여 이들 약제를 저산도환경에 적응된 세포들(low pH- adapted cells)에 투여한 후 온열치료를 병행하였는데 이때 저산도환경에 적응된 세포들은 그렇지 않은 경우보다 약제 및 온열 병용에 대한 세포치사 효과가 감소되었다고 보고하고 있다. 또 Herman등[35]은 CDDP를 사용하여 세포군을 충분히 산소공급을 받고 있는 군과 저산소하에 있는 군으로 나누어 실험을 진행하였는데 가온을 하지 않고 37℃의 중성환경에서 약제를 투여한 경우 저산소 세포하에 있는 세포나 산소공급을 충분히 받고 있는 세포에서 모두 약제에 대한 세포치사 효과에 큰 차이가 없었으나 각군의 세포를 가온시켰을 경우 산소 공급을 충분히 받고 있는 세포군에서 현저한 세포치사 증강 효과를 관찰하였고 저산소하의 세포들은 가온에도 불구하고 약제의 세포 독성에 큰 변화가 없었다고 보고하였다. 그러나 이들은 동일한 실험을 pHe 6.45의 산성환경에서 진행하였을 때 oxic cells과 hypoxic cells 모두에서 약제에 대한 온열치료 병용 효과가 뚜렷이 증가하였다고 하면서 환경산도의 증가로 온열약제의 복합치사 효과를 높일수 있음을 시사하였다. Teicher등[36]도 cisplatin의 analog인 $ptcl_4$ (Fast Black)를 사용하여 유사한 결과를 얻고 있는데 이들은 37℃에서는 약제의 효과가 중성이나 산성환경에 무관한 반면 가온을 할 경우 oxic cell들은 중성환경에서 더 높은 치사 효과를 보인 반면 hypoxic cells은 산성환경에서 약제에 의한 세포 독성이 더 현저해졌다고 보고하고 있다.

이상의 결과로 볼 때 환경산도의 변화는 온열치료나 항암제를 단독으로 사용하였을 경우처럼 두치료를 병용하였을 경우에 그 치사 효과를 증가시킴을 알 수 있고 이러한 현상은 종양세포처럼 저산소하의 세포들에서 더 현저할 것으로 사료된다. 그러나 이러한 결과가 세포외 산도(pHe)와 세포내 산도(pHi) 중 어느쪽에 더 영향을 받는지에 대해서는 아직까지 보고된 바가 없다.

저자들은 약제나 온열치료 단독처리의 경우 세포내 산도(pHi)가 세포외 산도(pHe)보다 세포치사 효과에 더 큰 영향을 준다는 사실에 착안하여 세포내 산도를 선택적으로 증가시킨 후 약제와 온열치료를 병행할 경우 세포내 산도 변화가 이러한 병용치료의 세포치사 효과도 증폭시킬 수 있다는 가정하에 실험을 진행하였다. 본 실험에 사용한 HMA는 이미 Song등[16] 이 세포내 산도를 선택적으로 상승시키는 약제로 확인한바 있고 특히 온열치료와 병행하여 사용하였을 경우 세포치사 효과가 탁월하였음은 보고된 바 있다. 본 실험에서 이 약제를 10mg/kg 로 균일하게 사용하여 가온 및 약제의 처치를 하였는데 예상대로 HMA 를 사용하지 않은 경우보다 현저한 세포치사 증강효과가 나타났고 이러한 결과는 종양 성장지연 실험이나 excision assay 모두에서 일관된 결과를 보여 줌으로써 세포내 산도 증가가 온열 및 약제의 세포치사 효과를 증가시키는 것을 분명히 알 수 있었다. 특히 저자들은 HMA를 사용하지 않고 약제와 온열치료만 병행하였을 때도 각각 단독 처리의 경우보다는 그 치사효과가 훨씬 높아짐을 확인할 수 있었는데 이는 다른 약제를 사용하여 보고한 여러 저자들의 결과와 일치하였고 나아가 HMA에 의한 약제 증강 효과까지 가늠할 수 있는 척도가 되었다. 즉 종양성장지연의 실험에서는 HMA를 사용하여 약 6일간의 성장지연을 보였고(Fig. 3) excision assay에서는 약 30배 이상의 세포치사 효과를 보임으로써 (Fig. 4) 세포내 산도 증가로 인한 세포치사의 증강 효과를 객관적으로 입증할 수 있었다. 이러한 세포치사 증강 효과는 다른 항암 약제에서도 유사한 결과가 나올 것으로 기대되며 저자들은 Bleomycin, Cisplatin 등을 사용한 실험을 계속 진행 중에 있다. 한편 이러한 세포내 산도가 약제온열 병용치료에 미치는 영향의 기전에 대해서는 여러가지 추정이 가능한데 현재까지는 Hahn등[33, 34]이 시사한 바가 가장 유력한 이론적 근거가 될 수 있겠다. 즉 가온 자체가 약제의 세포내 섭취를 증가시킨다고 볼 때 세포내 산도가 증가되면 가온으로 인해 증가된 약제의 세포내 이동이 더욱 가속화 될 것이다. 아직까지 melphalan의 경우 세포내로 유입되 세포 독성을 야기하는 최종 목표물(target)인 DNA의 손상은 DNA strand간의 cross-link가 증가되어 초래된다는 보고가 유력하다[37]. 따라서 향후 DNA cross-link의 정도를 객관적으로 파악할 수 있는 수단만 강구된다면 HMA투여로 인한 약제의 세포내 유입(influx)이 온열 치료시 어떻게 변화하는지 보다 명확하게 규명할 수 있을 것으로 사료된다.

저자들의 실험 결과를 미루어 볼 때 세포내 산도가 증가되어 약제와 온열치료의 병행효과가 가속화됨은 명확하나 HMA가 생체내 사용되어졌을 때 초래될 수 있는 독성이나 부작용에 대한 연구는 전무한 실정임으

로 이에 대한 규명이 확실히 이루어진후 이 약제의 임상적용의 가능성도 고려해 볼 수 있다 하겠다.

결 론

1) Melphalan을 온열치료(42℃/1hr)와 병행하여 사용하였을 경우 약제 단독으로 초래되는 세포치사 효과를 현저히 증가시켰다.

2) HMA를 사용하여 세포내 산도를 증가시켰을 경우 melphalan과 온열치료 병용에 의한 세포치사 효과가 세포내 산도가 증가되지 않은 경우보다 30배 이상 증가되었다.

3) 항암제를 온열치료와 병행하여 사용할 경우 세포내 산도를 증가시키면 세포치사 효과를 현저히 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. **Nielson OS, Overgaard J.** Effect of extracellular pH on thermotolerance and recovery of hyperthermic damage in vitro. Cancer Res 1979; 39:2772-2775
2. **Hofer KG, Mirechi NF.** Tumor cell sensitivity to hyperthermia as a function of extracellular and intracellular pH. J Natl Cancer Inst 1980; 65: 621-625
3. **Gerweck LE, Dahlberg WK, Greco B.** Effect of pH on single or fractionated heat treatment at 42-45℃. Cancer Res 1983; 43:1163-1165
4. **Miyakoshi J, Oda W, Hirata M, et al.** Effects of amiloride on thermosensitivity of Chinese Hamster Cells under neutral and acidic pH. Cancer Res 1986; 46:1840-1844
5. **Ruifrok ACC, Konings AWT.** Effects of amiloride on hyperthermic cell Killing of normal and thermotolerant mouse fibroblast LM cells. Int J Radiat Biol Phys 1987; 52:385-390
6. **Chu GL, Dewey WC.** Effect of hyperthermia on intracellular pH in Chinese Hamster Ovary cells. Radiat Res 1987; 110:439-442
7. **Cook JA, Fox MH.** Effects of acute pH6.6 and 42℃ heating on the intracellular pH of Chinese Hamster Ovary cells. Cancer Res 1988; 48:497-501
8. **Hahn GM.** Potential for therapy of drugs and hyperthermia. Cancer Res 1979; 39:2264-2268
9. **Barlogie B, Corry PM, Drewinko B.** In vitro thermochemotherapy of human colon cells with cis-dichlorodiamine platinum(II) and mitomycin. Cancer Res 1980; 40:1165-1168
10. **Bates DA, Mackillop WJ.** The effect of hyperthermia on the uptake and cytotoxicity of melphalan in Chinese Hamster Ovary Cells. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1989; 16:187-191
11. **Bates DA, Mackillop WJ.** The effect of hyperthermia in combination with melphalan on drug-sensitive and drug-resistant CHO cells in vitro. Br J Cancer 1990; 62:183-188
12. **Hahn GM, Shiu EC.** Effect of pH and elevated temperatures on cytotoxicity of some chemotherapeutic agent on Chinese hamster cells in vitro. Cancer Res 1983; 43:5789-5791
13. **Urano M, Kahn J, Kenton LA.** Effect of belomycin on murine tumor cells at elevated temperatures and two different pH values. Cancer Res 1988; 48:615-619
14. **Hindenberg AA, Stewart VJ, Baker MA.** Effect of pH on cellular accumulation of donaurubicin (Abstract 1031). Am Assoc Cancer Res 1987; 28:261
15. **Lee SY, Ryu KH, Kang MS, Song CW.** Effects of hyperthermia on the lactic acid and β-hydrobutyric acid content in tumor. Int J Hypertherm 1986; 2:213-222
16. **Song CW, Lyons JC, et al.** Effects of HMA, an analog of amiloride, on the thermosensitivity of tumors in vivo. Int J Radiat Biol Phys 1994; 30:133-139
17. **Hall EJ.** Radiobiology for the Radiologist. Hyperthermia. 4th ed. Philadelphia, JB Lippincott Co. 1994; 260-262
18. **Eddy HA.** Microangiographic techniques in the study of normal and tumor tissue vascular systems. Microvasc Res 1976; 11:391-413
19. **Peterson HI.** Tumor blood circulation; Angiogenesis, vascular morphology and blood flow of experimental and human tumors. Boca Raton, FL: CRC Press, 1978
20. **Emami B, Nussbaum GH, Hahn N.** Histopathological study on the effects of hyperthermia on microvasculature. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1981; 7:343-346
21. **Fajardo LF.** Pathological effects of hyperthermia in normal tissues. Cancer Res 1984; 44: 4826-4829
22. **Song CW.** Effect of local hyperthermia in blood flow and microenvironment; a review. Cancer Res 1984; 44:4721s-4730s

23. **Hetzel FW.** Biological rationale for hyperthermia. Radiol Clin North Am 1987; 27:499-508
24. **Reinhold HS, Endrich B.** Tumour microcirculation as a target for hyperthermia. Int J Hyperthem 1986; 2:111-137
25. **Rhee JG, Kim TH, Levitt SH, Song CW.** Changes in acidity of mouse tumors by hyperthermia. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1985; 10: 393-399
26. **Van den Berg AP.** Tissue pH of human tumors and its variation upon therapy in tumor blood supply and metabolic microenvironment. Funktionsanal Biol Syst 1991; 20:234-235
27. **Kim GE, Song CW, Lyons JC, Rhee JG.** Modifying effect of amiloride on thermotolerance of mouse mammary carcinoma cells in vitro (Abstr. 115). Int J Radiat Oncol Biol Phys 1988; 15:175
28. **Kim GE, Lyons JC, Song CW.** Effects of amiloride on intracellular pH and thermosensitivity. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1991; 20: 541-549
29. **Jahde E, Glusenkamp KH, Klunder I, et al.** Hydrogen ion-mediated enhancement of cytotoxicity of bis-chlorethylating drugs in rat mammary carcinoma cells in vitro. Cancer Res 1989; 49:2965-2972
30. **Karsgard LD, Chaplin DJ, et al.** The effect of hypoxia and low pH on cytotoxicity of melphalan and chlorambucil in vitro (Abstr. 23). Proceedings of the 7th International Conference on Chemical Modifiers of Cancer Treatment, Clearwater, Florida, 1991, Feb 2-5
31. **Kennedy KA. McGurl JD, Leondaridis L, Alabaster O.** pH dependent of mitomycin C-induced cross-linking activity in EMT6 tumor cells. Cancer Res 1985; 45:3541-3547
32. **Ferguson PJ, Phillips JR, Selner M, Case CE.** Differential activity of vincristine and vinblastine against cultured cells. Cancer Res 1984; 44:3307-3312
33. **Hahn GM.** Hyperthermia to enhance drug delivery. In: Alan R. Liss, Rational basis for chemotherapy. New York, 1983; 427-436
34. **Hahn GM, Shiu E.** Adaptation to low pH modifies thermal and thermochemical response of mammalian cells. Int J Hypertherm 1986; 2:379-387
35. **Herman TS, Teicher BA, Collins LS.** Effect of hypoxia and acidosis on the cytotoxicity of four platinum complexes at normal and hyperthermic temperatures. Cancer Res 1988; 48: 2342-2347
36. **Teicher BA, Herman TS, et al.** Interaction of $PtCl_4$(Fast Black)2 with hyperthermia. Cancer Res 1989; 49:6208-6219
37. **Hansson J, Lewensohn R, et al.** Formation and removal of DNA cross- links induced by melphalan and nitrogen mustard in relation to drug-induced cytotoxicity in human melanoma cells. Cancer Res 1987; 47:2631-2637